

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670281

研究課題名(和文)分泌型神経筋シナプスマーカーを用いた加齢性筋萎縮の診断法開発

研究課題名(英文)Development of Diagnostics for Sarcopenia with Secretary Neurosynaptic markers

研究代表者

芝崎 太 (SHIBASKI, Futoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・参事研究員

研究者番号：90300954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請において、サルコペニアに特異的なバイオマーカー(A蛋白とする)測定系として、高感度同時多項目測定(MUSTag)法を開発し、述べ2,000例以上の患者サンプルでの検定を行った。(1)感度は $R^2 = 0.95$ 法で16 pg/mL、 $3 \times S.D.$ 法で0.6 pg/mL、正常位被験者で約300 pg/ml以下であったが、患者対象被験者では500-4800 pg/mlの範囲で高値が認められた。これらの結果から対象患者の血中A蛋白量は、骨格筋量が多く同化作用が促進する環境では値が増加し、一方、代謝の亢進、炎症といった異化作用が促進する環境では値が減少する可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The early diagnosis for Sarcopenia is an urgent need for preventing irreversible muscle atrophy and for proper treatment. We succeeded in developing high sensitive multiple simultaneous Tag (MUSTag) method using specific biomarker (Protein A) for sarcopenia. In this assay, the sensitivity was calculated as 16 pg/mL ($R^2 = 0.95$) and 0.6 pg/mL ($3 \times S.D.$) in the healthy volunteer, the range is less than 300 pg/ml, but the values were measured from 500-4,800 pg/ml in patients of sarcopenia. These results suggested the following possibilities; (1) the concentration of serum protein A shows the tendency of increase in the condition in which anabolic metabolism is promoted in the normal muscle volume. (2) in the contrast, the concentration does the tendency of decrease in the condition in which catabolic metabolism is promoted in such as inflammation and enhancement of the metabolism.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：筋萎縮 サルコペニア 診断

1. 研究開始当初の背景

介護予防や臨床の現場では、特に加齢性筋肉減少症（サルコペニア）において、筋力、筋量、運動能力の測定、聞き取りによる日常活動のスコアを用いて診断を行っている。ただ、これらの方法は有効性が乏しく、筋萎縮が進むと不可逆性の筋の変化を早期に発見し、筋萎縮の予防・治療を可能にすることが急務である。このため神経・筋の機能・構造の維持に直接関わる分子をバイオマーカーとして使うことができれば診断の特異性は高いが、これまで適切な分子はみつからなかった。共同研究者の重本等は、神経筋シナプスの筋側（後膜）に発現するチロシンキナーゼである受容体型 MuSK が、膜結合ドメインより上流のエキソンでスプライシングをうけることにより分泌型 MuSK を生じる事実をもとにさらに詳細な研究を行った結果、マウス神経筋シナプスの形態縮小・機能低下が進行中のマウスにおいて mRNA 発現量が上昇していること、ギブス固定拘束による廃用性筋萎縮に対する機能回復訓練を行った患者 20 名に対して、血中の MuSK タンパク質レベルと骨格筋の状態（量、機能）との間に正の相関が認め、MuSK が骨格筋の状態を把握するためのバイオマーカーとして利用できることを見出した（2015 年 4 月 3 日出願：PCT/JP2015/060671）。分泌型 MuSK は筋肉量の改善に伴って上昇するものの、筋萎縮時には血中濃度が極めて低く、超高感度な測定法による診断法開発が必須な状況である。

2. 研究の目的

本研究では実用化を見据えた分泌型 MuSK 測定法の基盤技術をこれまでに我々が独自開発した超高感度同時多項目測定（MUSTag）法（WO2006/049289、特許第 4111984 号、日

本では特許成立）を応用し、臨床サンプルによる検証、最終的にはその技術を企業に導出することを目指す。

具体的な達成目標は、分泌型 MuSK に対する高親和性抗体の取得、本測定にあった MUSTag 法の改良、高い特異性と感度（～数 10 fg/ml）で、低浸襲的に得られる検体（血液など）を用いて、共同開発による MUSTag 全自動機にて測定可能な系の開発である。測定に必要な抗体は既に作製を進め、一部のモノクローナル抗体は取得済みである。また、今後の臨床現場での使用を考慮し、Point of Care Testing (POCT)の実現するため、現在当研究室において開発中の新規高感度イムノクロマト法への適応も視野に入れる予定である。

超高齢社会を背景に、加齢性筋萎縮（サルコペニア）時の運動機能低下に加え、筋萎縮を伴う重症筋無力症、神経筋難病（筋萎縮性側索硬化症、筋強直性ジストロフィー等）、廃用性萎縮等の疾患での客観的な診断法はまだ存在せず、これらの疾患の早期診断・予防・治療・効果的な介護を可能にするバイオマーカーおよびその診断法の開発が強く求められている。本研究により、分泌型 MuSK の有用性を証明するとともに、高感度診断法や機器開発が進むことにより、上記の疾患の診断や治療に大きな貢献をするだけでなく、リハビリ効果判定などへの波及も期待できる。

3. 研究の方法

患者の検体は東京都健康長寿医療センター、および都立病院より提供を受ける。東京都健康長寿医療センターでは筋組織バンクがすでにあり、現在測定準備中である。当研究室において MUSTag 法を主体とした検出系の開発を行い、企業に技術を導出、実用化

を目指す。MUSTag 全自動測定装置は、別のプロジェクトで開発中であり、本研究の目的に合った仕様に変更する必要がある。また、高感度イムノクロマトにおいてもこれまでの開発プロジェクトにより、企業との連携体制は既に整っているため、応用には少ない仕様変更で対応可能である。

本研究は当研究所でのトランスレーショナル・リサーチの一環として、臨床との密接な連携体制を保ち、また企業とも共同で開発を行うことにより推進される。特に昨年当研究所が中心となり設立した「東京バイオマーカー・イノベーション技術研究組合（略称：とびら）」と橋渡し研究や産学連携を効率的に進める。

平成 25 年度：

分泌型 MuSK 抗体の作製継続と検定、至適化、MUSTag 化。臨床サンプル(1,000 以上)による特異性検定。MUSTag 全自動機器の開発と仕様決定(企業との連携)

平成 26 年度：

分泌型 MuSK 抗体の至適化、品質管理。加齢性筋萎縮症の判定、リハビリ後の筋肉量評価に関するカットオフ値の設定。MUSTag 全自動機器のプロトタイプ完成(企業との連携)。既存で開発した高感度イムノクロマト法への応用。対象疾患別の大規模、多施設臨床試験への準備)

平成 27 年度(繰り越し年)：

H26 年度までに完了しなかったサイトカインの追加実験を行った。

4. 研究成果

本申請において、共同研究者の重本等は、サルコペニアに特異的なバイオマーカー(分泌型 MuSK)を発見し、詳細な研究を行った結果、マウス神経筋シナプスの形態縮小・機

能低下が進行中のマウスにおいて mRNA 発現量が上昇していること、ギブス固定拘束による廃用性筋萎縮に対する機能回復訓練を行った患者 20 名に対して、血中の分泌型 MuSK レベルと骨格筋の状態(量、機能)との間に正の相関が認め、分泌型 MuSK が骨格筋の状態を把握するためのバイオマーカーとして利用できることを見出した。これらの結果より、血液中の分泌型 MuSK を測定するため、申請者等が開発した高感度同時多項目測定(MUSTag)法を用いて、測定法の開発を行った。これまでの結果として、(1)分泌型 MuSK に特異的に反応するペアーの抗体を決定。(2)改良 MUSTag 法として、磁気ビーズを用いたバックグラウンドの低減と高感度を目指し、さらにアッセイ法の最適条件を決定した。感度を評価したところ $R^2 = 0.95$ 法で 16 pg/mL、 $3 \times S.D.$ 法で 0.6 pg/mL であった。本改良 MUSTag 法にて述べ 2,000 例以上の患者サンプルでの検定を行った。血清中の分泌型 MuSK の濃度は、正常位被験者で約 300 pg/ml 以下であったが、患者対象被験者では 500-4,800 pg/ml の範囲で拘置が認められた。(3)TGF-beta 等のサイトカイン等の検討では、測定範囲内では有為に病状に相関するものが明確に決定できなかった。これらの結果から対象患者の血中分泌型 MuSK 蛋白量は、骨格筋量が多く同化作用が促進する(anabolic)環境では値が増加し、一方、代謝の亢進、炎症といった異化作用が促進する(catabolic)環境では値が減少する可能性が強く示唆された。これらの結果より、当初目標であった分泌型 MuSK 蛋白量とサルコペニアの筋肉量が相関することやリハビリ後の効果を反映するかどうかの評価は終了し、私達が仮定していた内容がほぼ証明された。ただ、本申請で進めるべきサイトカイン等の測定に関しては、まだ、十分進んでないこと

より、今後はこれらの測定を進め、総合的に確実にサルコペニアやリハビリ後の指標となるバイオマーカーの組み合わせを決定すること、同時に、分泌型 MuSK 蛋白量の変化が代謝や炎症などのとの関連の有無、等に関してもさらに詳しい解析を行う必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. S. Hasan, J. Dong, Y. Hara, Y. Morizane, F. Shibasaki and *H. Ueda. "Protein-based open sandwich immuno-PCR for sensitive detection of small biomarkers." doi.org/10.2116/analsci.29.871 *Anal Sci* 29(9): 871-876, 2013. (査読有り)
2. R. Miyashita, L. Chen, Y. Morizane, Y. Takeshita, H. Fukui, T. Ishizaki, K. Hatakeyama, K. Ohseto, F. Shibasaki and *H.Uchino. "Cytokine marker measurement in human neuroblastoma cells with supersensitive and multiplex assay: MUSTag technology." doi: 10.1007/978-3-7091-1434-6_62 *Acta Neurochir Suppl* 118: 317-320, 2013. (査読有り)
3. S. Nakano, Y. Morizane, N. Makisaka, T. Suzuki, T. Togawa, T. Tsukimura, I. Kawashima, H. Sakuraba and *F. Shibasaki. "Development of a Highly Sensitive Immuno-PCR Assay for the Measurement of alpha-Galactosidase A Protein Levels in Serum and Plasma." doi: 10.1371/journal.pone.0078588P *PLoS ONE* 8(11): e78588, 2013. (査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

1. *芝崎 太、中野早知栄、小林行治、兎川忠靖、月村考宏、櫻庭 均: Fabry 病診断のための高感度・簡易測定系の開発 臨床遺伝学公開シンポジウム 2015.03.12 明治薬科大学(東京都・清瀬市)
2. *Shibasaki F, Oboki. K, Nomura N, Migita T, Ogawa M, Ohishi T, Kajiwara, N, Sadato D, and Koide T. R&D of Innovative Devices for Self-Care Monitoring and OTC Diagnosis Based on Industry-Academia Cooperation. YONSEI BK21PLUS - CBSM International Joint Symposium. 2014. 6. 21, Gunja village, Andong, Korea
3. *Shibasaki F, Nakano S, Togawa T,

Tsukimura T, Kawashima I, and Sakuraba H.: Development of a highly sensitive immune-PCR measurement of alpha-galactosidase A protein levels in serum and plasma. The 3rd Asian congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) & The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). 2013.11.27 Maihama, Chiba.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.molmed.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者:

芝崎 太 (SHIBASAKI, Futoshi)
公益財団法人東京都医学総合研究所
ゲノム医科学研究分野・参事研究員
研究者番号: 90300954

(2) 研究分担者:

無し

(3)連携研究者:

梶原直樹 (KAJIWARA, Naoki)
公益財団法人東京都医学総合研究所
ゲノム医科学研究分野・主任研究員
研究者番号: 70453917

野村奈美子 (NOMURA, Namiko)
公益財団法人東京都医学総合研究所
ゲノム医科学研究分野・主任基盤技術研究
職員
研究者番号: 50599694